

れたが、p 値 0.09 と有意な差とは言えなかった。

#### D. 考察

MDS 症例における Evi-1 アイソフォームの発現は、Evi-1a が 11% と従来 of 報告に近いのに対し Evi-1c の発現例が 17% と意外に多いことが明らかとなった。しかし今回の解析では、Evi-1 アイソフォーム発現の有無は MDS 症例の予後に影響しなかった。白血病への進行までの時間については、Evi-1a の発現例で短い傾向が見られたものの有意な差ではなく、現時点では Evi-1a の発現により白血病への進行が明らかに促進されるとは言えなかった。今後、解析症例の蓄積が待たれる。

#### E. 結論

MDS 症例において、Evi-1 アイソフォーム発現の有無は、予後および白血病への進行までの時間と明らかな関連は認めなかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawazu M, Asai T, Saito T, Goyama S, Mitani K, Miyazono K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M\*, and Hirai H. Functional domains of Runx1 are differentially required for CD4 repression, TCR  $\beta$  expression, and CD4/8 double-negative to CD4/8 double-positive transition in thymocyte development. *J Immunol* 174: 3526-3533, 2005. (\*corresponding author)

2. Komeno Y, Kurokawa M\*, Imai Y, Takeshita M, Matsumura T, Kubo K, Yoshino T, Nishiyama U, Kuwaki T, Kubo K, Osawa T, Ogawa S, Chiba S, Miwa A, and Hirai H. Identification of Ki23819, a highly potent inhibitor of kinase activity of mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Leukemia* 19: 930-935, 2005. (\*corresponding author)

3. Nitta E, Izutsu K, Imai Y, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M\*, and Hirai H. Oligomerization of Evi-1 regulated by the PR domain contributes to recruitment of corepressor CtBP. *Oncogene* 24: 6165-6173, 2005. (\*corresponding author)

4. Seo S, Asai T, Saito T, Morishita Y, Suzuki T, Nakamoto T, Ichikawa M, Yamamoto G, Kawazu M, Yamagata T, Sakai R, Mitani K, Ogawa S, Kurokawa M\*, Chiba S, and Hirai H. Cas-L is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J Immunol* 175: 3492-3501, 2005. (\*corresponding author)

##### 2. 学会発表

仁田英里子、伊豆津宏二、山口祐子、今井陽一、小川誠司、千葉滋、黒川峰夫、平井久丸：白血病関連遺伝子産物 Evi-1 の多量体化とその造腫瘍性に於ける意義。

第 64 回日本癌学会学術総会

2005 年 9 月 14 日 札幌

## 後天性再生不良性貧血に対する非血縁者間同種骨髄移植に関する研究

研究協力者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授

矢部善正、加藤俊一、加藤剛二、坂巻壽、気賀沢寿人、生田孝一郎、

原純一、土田昌宏、森島泰雄、小寺良尚、日本骨髄バンク

### 研究要旨

日本骨髄バンクを介して移植された後天性再生不良性貧血 (AA) 215 例の登録データを用いて、患者とドナー間における HLA 抗原不適合が予後に与える影響を検討した。A/B 抗原不適合を含め、1 抗原不一致のみでは完全一致群との間で生存率の差はみられないが、A/B 抗原不一致に C 抗原や HLA クラス II 抗原の不一致が重なった 2 抗原不一致例や 3 抗原不一致例では生存率は劣っていた。

#### A. 研究目的

後天性 AA に対する非血縁者間同種骨髄移植 (UBMT) におけるドナー/患者間の HLA 不適合の意義を明らかにする。

#### B. 研究方法

1993 年から 2003 年の期間に、日本骨髄バンクを介して UBMT をうけた後天性 AA 患者は 215 例である。このうち患者とドナー間で HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 の 10 アレルが検査済の 79 例について、HLA の不適合が拒絶、急性 GVHD、慢性 GVHD や生存に与える影響について、単変量および多変量解析を用いて検討した。患者の年齢の中央値は 15 歳 (3-46 歳)、移植前治療は TBI+CY+ATG (26 例)、LFI+CY+ATG (15 例)、TBI+CY (20 例)、LFI+CY (9 例)、その他 9 例であった。

#### C. 研究結果

血清学的に HLA-A, B, DR 抗原が適合していても、10 アレルが一致したのは 26 例のみで、1 アレルの不一致例が 18 例、2 アレルの不一致が 26 例、3 アレル以上の不一致が 9 例にみられた (表 1)。

単変量解析では、HLA の不一致度は生着不全や急性 GVHD の危険因子であったが、慢性 GVHD

の発症とは関連がみられなかった (表 2)。多変量解析においては、A/B アレルを含めて 1 アレルのみでの不適合では完全一致例と比較して生存率の差はみられなかった。また、HLA-C アレルの不一致に DRB1 あるいは DQB1 アレルの不一致が重なっても、生存率は完全一致例と比較して差はみられなかった。一方、A/B アレルの不一致に C アレルの不一致が重なったり、3 アレル不一致例では生存率は有意に劣っていた (表 3)。

#### D. 考案

HLA の適合度を A, B, DRB1 抗原の 6 アレルのみで検討した場合には、HLA-A/B 抗原の不一致は予後不良因子であり、このようなドナーからは移植すべきではないと考えられてきた<sup>1)</sup>。今回の 10 アレルを検討した場合には、A/B アレルの不一致のみでは移植は許容され、さらに C やクラス II アレルの不一致が加わった場合には、生存率が低下することが判明した。

#### E. 結論

10 アレルの HLA 抗原を検索したうえでドナー選択を考慮することで、後天性 AA に対する UBMT の治療成績の向上が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hirano N, Kojima S et al.: Presence of anti-kinectin and anti-PMS1 antibodies in Japanese aplastic anemia patients. Br J Haematology 128: 221-223, 2005

2) Kojima S et al.: International consensus conference on bone marrow failure syndromes: Review and recommendations. Aplastic anemia. Int J Hematology 82: 408-411, 2005

3) Juan Liang, Kojima S et al.: Mutations in telomerase catalytic protein genes in Japanese children with aplastic anemia. Haematologica (in press)

1. 学会発表

1) Kojima S et al.: Effects of HLA-C and HLA-DQB1 mismatching on outcome of unrelated donor marrow transplantation for patients with severe aplastic anemia. The 47th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, 2005

2) Yagasaki H et al.: Prospective randomized multicenter study comparing antithymocyte globulin(ATG) alone with ATG plus cyclosporine (CsA) for treatment of children with nonsevere aplastic anemia. The 47th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, 2005

3) Ichihashi R, Kojima S et al.: Novel anti-hemoglobin F antibody in bone marrow can predict a response to antithymocyte globulin and cyclosporine in patients with

aplastic anemia. Retrospective study of 28 cases. The 47th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, 2005

4) Kojima S et al.: Tacrolimus/methotrexate (MTX) versus cyclosporine/MTX for graft-versus-host disease(GVHD) prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received marrow transplantation from unrelated donors: Results of a matched pair analysis. The 47th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, 2005

参考文献

1) Kojima S et al.: Blood 100: 799-803, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1

## Recipient-donor HLA matching by DNA typing

	No. of Patients
1) HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQB1 matched	26(33%)
2) HLA-A/B mismatched	6(8%)
3) HLA-C mismatched	7(9%)
4) HLA-DRB1/ DQB1 mismatched	5(6%)
5) HLA-A/B and C or DRB1/DQB1 mismatched	18(23%)
6) HLA-C and DRB1/DQB1 mismatched	8(10%)
7) HLA-A/B and C and DRB1/DQB1 mismatched	9(11%)

表2

## Significance of HLA matching : Univariate analysis

	Graft failure P.	Grade III/IV acute GVHD		Chronic GVHD P.	
		P.	3/25	P.	5/21
HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQB1 matched	2/26	0.066	3/25	0.004	5/21
HLA-A/B mismatched	0/6		1/6		1/4
HLA-C mismatched	0/6		2/6		2/6
HLA-DRB1/ DQB1 mismatched	0/5		0/5		1/5
HLA-A/B and C or DRB1/DQB1 mismatched	2/17		3/16		3/12
HLA-C and DRB1/DQB1 mismatched	0/7		1/7		2/6
HLA-A/B and C and DRB1/DQB1 mismatched	3/7		4/4		2/2

表3

Significance of HLA matching on survival;  
Multivariate analysis

	Relative risk (95% CI)	P.
HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQB1 matched	1.00	
HLA-A/B mismatched	2.56(0.50-13.1)	0.26
HLA-C mismatched	2.77(0.50-15.3)	0.24
HLA-DRB1/ DQB1 mismatched	0.90(0.11-7.34)	0.93
HLA-A/B and C or DRB1/DQB1 mismatched	4.24(1.57-11.5)	0.005
HLA-C and DRB1/DQB1 mismatched	1.69(0.43-6.58)	0.45
HLA-A/B and C and DRB1/DQB1 mismatched	20.0(5.57-71.6)	0.001

## 活性型 FKHL1 による CML 治療薬イマチニブ耐性の解除

研究協力者 小松 則夫 (山梨大学医学部附属病院・教授)

### 研究要旨

本研究では活性型 FKHL1 が CML 細胞においてイマチニブ耐性を克服できるかどうかを検討した。CML 由来のイマチニブ耐性細胞株において活性型 FKHL1 を核内に発現誘導させると細胞増殖と細胞周期の進行が抑制され、FKHL1 の標的分子である TRAIL の発現亢進とアポトーシスが誘導された。さらに TRAIL の強制発現によってアポトーシスが誘導された。したがって FKHL1 を活性型に変換することで TRAIL の発現を誘導し、イマチニブ耐性を解除できる可能性がある。

### A. 研究目的

イマチニブ (グリベック®: STI571) は慢性骨髄性白血病 (CML) 治療薬として開発された分子標的薬剤で BCR-ABL チロシンキナーゼの ATP 結合部位に構造特異的に結合し、ATP 活性を競合的に阻害することによりチロシンのリン酸化を阻害して CML 細胞にアポトーシスを誘導する。現在 CML に対する第一選択薬として使用されているが、使用症例を重ねるにつれイマチニブ不応症例やイマチニブ耐性化症例が認められるようになってきた。現在までにいくつかの耐性メカニズムが明らかとなり、BCR-ABL 遺伝子の増幅や点突然変異などが報告されているが、イマチニブ耐性化症例は予後が不良であることも明らかとなっており、イマチニブ耐性機序の解明、イマチニブ耐性の克服が重要な課題である。

FKHL1 は AFX や FKHL と同様に Forkhead Family に属する転写因子の一つで、細胞内で活性化された Akt により直接的にリン酸化される。リン酸化された状態では細胞質にとどまり、非活性型となって転写因子としての機

能を失う。一方、脱リン酸化された状態では核内へ移行し、活性型として標的遺伝子の転写を直接活性化する。我々は FKHL1 が CML 細胞における BCR-ABL からのリン酸化シグナル伝達経路の下流に存在し、イマチニブによる細胞周期の停止やアポトーシスの誘導に関与していることを明らかにし、FKHL1 が CML 治療上の標的分子となりうることを提唱した。

イマチニブ耐性細胞株では BCR-ABL チロシンキナーゼ活性はイマチニブにより抑制されるが、FKHL1 のリン酸化は解除されないことから、FKHL1 が脱リン酸化を受けずに転写因子としての活性を持たないことがイマチニブ耐性の機序の一つであり、FKHL1 を活性型に変換できればイマチニブ耐性 CML 細胞にアポトーシスを誘導できるのではないかと仮定し、それを実証するために本研究を計画した。

### B. 研究方法

CML 由来のイマチニブ耐性細胞株 K562/SR、KCL22/SR、KU812SR に FKHL1 の 3 箇所全てのリン酸化部位に変異を加えた活性型 FKHL1 (FKHL1-TM) とエストロゲンレセプター (ER)

との融合蛋白を発現し、タモキシフェンにより核内に誘導可能なシステムを樹立した。

#### C. 研究結果

1) K562/SR、KCL22/SR、KU812/SR 細胞株ではイマチニブの存在にかかわらず、FKHRL1 は恒常的リン酸化されており不活性型の状態にある。2) イマチニブ処理によってイマチニブ感受性 CML 細胞株は TRAIL を産生したが、イマチニブ耐性株では産生しなかった。3) 活性型 FKHRL1 の過剰発現は K562/SR、KCL22/SR、KU812/SR 細胞にアポトーシスを誘導したが、その際 TRAIL の産生が認められた。4) TRAIL の細胞内過剰発現は K562/SR 細胞にアポトーシスを誘導した。

#### D. 考察

イマチニブ耐性の細胞株ではイマチニブ存在下で BCR-ABL チロシンキナーゼ活性が抑制されている状況においても FKHRL1 はリン酸化されたままの状態にあり、FKHRL1 はアポトーシスのエフェクターとしての機能を喪失し、イマチニブ耐性になっていると考えられた。そこで、活性型 FKHRL1 がイマチニブ耐性を克服できるかどうかを検討するためイマチニブ耐性細胞株を用いて FKHRL1-TMER システムを樹立し、すべての細胞株において活性型 FKHRL1 の核内強制発現によってアポトーシスが誘導されることを証明した。その際、FKHRL1 の標的分子である TRAIL が誘導された。このことは FKHRL1 の転写因子としての活性化および TRAIL の誘導が CML 細胞でのイマチニブによるアポトーシスの誘導に重要であることを意味するとともにこれらの分子の発現制御によってイマチニブ耐性を克服できることを

示唆している。

#### E. 結論

CML 細胞株において活性型 FKHRL1 がイマチニブ耐性を克服すること、TRAIL がイマチニブおよび FKHRL1 によるアポトーシス誘導に共通した実行因子の一つであることを明らかにした。FKHRL1 および TRAIL を含む BCR-ABL の下流分子はイマチニブ耐性 CML の治療戦略上注目すべき標的分子と考える。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kirito K, Fox N, **Komatsu N**, Kaushansky K: Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1 $\alpha$ . *Blood* 105: 4258-4263, 2005
2. Kanaji S, Tkanaji T, Jacquelin B, Chang M, Nugent DJ, **Komatsu N**, Moroi M, Izuhara K, Kunicki TJ: Thrombopoietin initiates demethylation-based transcription of *GP6* during megakaryocyte differentiation. *Blood* 105: 3888-3892, 2005
3. Toki T, Katsuoka F, Kanazaki R, Xu G, Kurotaki H, Sun J, Kamio T, Watanabe S, Tandai S, Terui K, Yagihashi S, **Komatsu N**, Igarashi K, Yamamoto M, Ito E: Transgenic expression of BACH1 transcription factor results in megakaryocytic impairment. *Blood* 105: 3100-3108, 2005

## 骨髄異形成症候群に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植に関する研究

研究協力者 谷本光音（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻腫瘍制御学教授）

### 研究要旨

高齢または合併症のために骨髄破壊的移植前治療を用いる同種造血幹細胞移植の適応とならない骨髄異形成症候群（MDS）患者に対する、骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の治療成績を検討した。血縁者からの移植では fludarabine+cyclophosphamide、非血縁者からの移植では fludarabine+busulfan を中心とした移植前治療を用いた。班研究と岡山大学において、それぞれ7例中3例、8例中3例が寛解を維持して生存を続けており、高齢や合併症のために従来からの骨髄破壊的移植前治療を用いた同種造血幹細胞移植の適応とならないMDS患者においても、RISTによって治療成績を向上できる可能性があることが確認された。

### A. 研究目的

特発性造血障害に関する調査研究班における「高齢者または臓器障害を有する high-risk 骨髄異形成症候群症例に対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植に関する臨床第 I/II 相試験」、及び岡山大学医学部・歯学部附属病院で同様の症例に行った RIST（reduced-intensity stem cell transplantation）の成績を解析し、高齢者または臓器障害を有する high-risk MDS に対する RIST の安全性と有効性を検討する。

### A. 研究方法

班研究では、移植前治療として fludarabine（25 mg/m<sup>2</sup>/day x 5 days）と cyclophosphamide（30 mg/kg/day x 2 days）（Flu/Cy）、GVHD 予防として cyclosporine A と methotrexate（CyA/MTX）を用いて HLA 一致同胞からの末梢血幹細胞移植（PBSCT）が行われた。岡山大学

では、HLA 一致血縁ドナーからの移植では Flu/Cy と CyA/MTX、非血縁骨髄ドナーからの移植では移植前治療として fludarabine（30 mg/m<sup>2</sup>/day x 6 days）と busulfan（4 mg/kg/day x 2 days）（Flu/Bu）、GVHD 予防として CyA/MTX、臍帯血移植では移植前治療として fludarabine（30 mg/m<sup>2</sup>/day x 6 days）+cyclophosphamide（25 mg/kg/day x 2 days）+TBI（2 Gy）（Flu/Cy/TBI）、GVHD 予防として cyclosporine A と mycophenolate mofetil（CyA/MMF）、芽球の制御がされていない臍帯血移植の1例では fludarabine（30 mg/m<sup>2</sup>/day x 4 days）（FLAG）と CyA/MTX を用いた。

### B. 研究結果

班研究では、2001年から2003年の間に7名（男性5名、女性2名、RAEB-t 5名、RA 1名、CMMoL 1名、年齢中央値63（27～67）歳）が登録された。1例（67歳男性 RAEB-t）

が原病悪化のために移植前に死亡し、6例に対して HLA 一致同胞から末梢血幹細胞移植が行われた。移植された6例のうち3例は原病の悪化のために、移植後75、98、200日目に死亡した。残りの3例では、いずれも完全キメラを達成し、平成18年1月末現在の観察期間は982日、1342日、1482日で、寛解を維持して生存している。急性GVHDは、移植された6例のうち3例に出現し、I度が1例、III度が2例であった。慢性GVHDは、評価可能4例中3例に出現し、いずれも全身型であった。

岡山大学では、2000年から2005年までに8名のMDS症例(男性7名、女性1名、RAEB 5名、RA 3名、年齢中央値55(54~67)歳)がRISTを受けた。RAEBの2例が移植後17日、52日に原病の悪化により、別のRAEBの2例が移植後72日、122日に再発して、それぞれ、150日、321日に死亡した。また、寛解を維持していたRA1例が閉塞性細気管支炎に合併した肺炎により移植後1018日に死亡した。平成18年1月末現在、RAの2例とRAEBの1例が寛解を維持している(移植後246日、358日、548日)。III度の急性GVHDが1例に発症し、慢性GVHDは移植後100日以上生存した6例中3例に発症し、いずれもextensiveであった。

#### C. 考察

MDSに対する同種造血幹細胞移植は治癒を期待できる治療方法であると考えられている。しかし、MDSの平均発症年齢が高いことから、従来からの骨髄破壊的移植前治療を用いた同種造血幹細胞移植の適応となる症例は少ない。

今回、特発性造血障害に関する調査研究班と岡山大学において行われてきた、MDSに対するRISTの成績を解析した。血縁者からの移植ではfludarabine+cyclophosphamide、非血縁者からの移植ではfludarabine+busulfanを中心とした移植前治療を用いた。本研究と岡山大学において、それぞれ7例中3例、8例中3例が寛解を維持して生存を続けており、高齢や合併症のために従来からの骨髄破壊的移植前治療を用いた同種造血幹細胞移植の適応とならないMDS患者においても、RISTによって治療成績を向上できる可能性があることが確認された。MDSのRISTにおいては、症例の選択、移植の時期、幹細胞のソース(骨髄、末梢血、臍帯血)、移植前治療(conditioning regimen)の種類、芽球の増加を伴う場合に移植前の化学療法を行うべきか、などに関して標準的なプロトコルは存在せず、引き続き治療研究が必要である。

#### D. 結論

fludarabineを中心とした移植前治療を用いた同種造血幹細胞移植は、年齢や合併症のために従来からの骨髄破壊的移植前治療を用いた同種造血幹細胞の適応とならないMDSにおいて治癒をもたらす可能性のある治療である。移植前治療、移植時期、移植の前に化学療法を行うべきかなどについて、引き続き検討が必要である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsuoka K, Ichinohe T,



- Hashimoto D, Asakura S, Tanimoto M, Teshima T. : Fetal tolerance to maternal antigens improves the outcome of allogeneic bone marrow transplantation by a CD4+ CD25+ T-cell-dependent mechanism., Blood. 2006 Jan 1;107(1):404-9. Epub 2005 Sep 8.
2. Teshima T, Matsuo K, Matsue K, Kawano F, Taniguchi S, Hara M, Hatanaka K, Tanimoto M, Harada M, Nakao S, Abe Y, Wake A, Eto T, Takemoto Y, Imamura M, Takahashi S, Ishida Y, Kanda Y, Kasai M, Takaue Y. : Impact of human leucocyte antigen mismatch on graft-versus-host disease and graft failure after reduced intensity conditioning allogeneic haematopoietic stem cell transplantation from related donors. Br J Haematol. 2005 Aug;130(4):575-87
2. 学会発表
1. Shiro Kubonishi, Yoshio Katayama, Shinya Yamaguchi, Hirokazu Tamamura, Nobutaka Fujii, Takeshi Watanabe, Fernando Arenzana-Seisdedos, Kazuma Ikeda, Mitsune Tanimoto, Sulfated Colominic Acid Enhances CXCR4 Function and Promotes Hematopoietic Stem /Progenitor Egress from Bone Marrow. Session Type: Poster Session 548-I, The American Society of Hematology 47th Annual Meeting and Exposition, 2005.12.10, Atlanta, GA, USA
2. Yoshihisa Koderu, Shunichi Kato, Mine Harada, Shintaro Shiobara, Nobuyuki Hamajima, Yasuo Morishima, Mitsune Tanimoto, Shigetaka Asano, Yasuo Ikeda, Hiroo Dohi, Tatsutoshi Nakahata, Masahiro Imamura, Keisei Kawa, Yoichi Takaue, Yoshinobu Kanda, Kazuhito Yamamoto, Genevieve Favre, Alois Gratwohl, Severe Adverse Events of Allogeneic Related Peripheral Blood Stem Cell Donors -Results of Nation-Wide 3,262 Consecutively and Prospectively Registered Case-Survey in Japan and of Its Comparison to the Outcome of Retrospective Survey Shared with EBMT for Stem Cell Donors. Session Type: Poster Session 277-I, The American Society of Hematology 47th Annual Meeting and Exposition, 2005.12.10,

Atlanta, GA, USA

3. 久保西四郎、品川克至、菊池智子、新谷大悟、増成太郎、藤井伸治、前田嘉信、石丸文彦、難波寛子、片山義雄、池田和真、谷本光音：進行期低悪性度リンパ腫に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植：第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会、

2005. 9. 17、横浜

4. Low-grade lymphoma および AML/MDS に対する RIST の成績、厚生労働省がん研究助成金「非血縁者間の同種血液幹細胞移植法による悪性腫瘍の治癒率向上に関する研究」班平成 17 年度班会議、2006. 2. 3、福岡

## 骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン A 療法の効果と骨髄病理学的検討

研究協力者 通山 薫 (川崎医科大学検査診断学 教授)

伊藤 満 (川崎医科大学検査診断学) 内山 卓、石川隆之 (京都大学血液腫瘍内科)、

小峰光博 (昭和大学藤が丘病院内科血液)

### 研究要旨

低リスク骨髄異形成症候群 (MDS) に対するシクロスポリン A (CSA) 療法は約半数の症例において血球回復効果をもたらすことが認知されてきた。本研究班において CSA 療法の前方視的治療研究が実施され、現在その結果を多角的に解析中である。本検討では治療前後における骨髄病理学的所見の変化を免疫組織化学染色にて検討し、治療反応性との関連を調べた。まだ解析途中であるが、骨髄過形成例では治療効果が期待できないなどいくつかの結果が示されつつある。

### A. 研究目的

シクロスポリン A (CSA) 療法を施行した低リスク骨髄異形成症候群 (MDS) の治療前後における骨髄病理学的所見の変化を免疫組織化学染色にて検討し、治療反応性との関連を調べることを目的とした。

### B. 研究方法

本研究班による治療研究「低リスク MDS に対する CSA 療法の有効性に関する研究」に登録された症例のうち、骨髄クロット標本の検討が可能であった 16 例を対象とした。薄切標本の HE 染色および各種免疫組織化学染色をおこない、骨髄細胞密度の評価および骨髄単位面積あたりの各陽性細胞数を算定して治療前後で比較検討し、治療反応性との関連を統計学的に解析した。

(倫理面への配慮)

上記治療研究に登録された患者においては

全例、提出検体の血液病理学的検討についてあらかじめ了解が得られていた。

### C. 研究結果

治療前後とも骨髄クロットの評価が可能であった症例は 16 例中 13 例であった。13 例の内訳は男女比 7 : 6、病型は RA12 例、RAEB 1 例であった。石川の集計によると、この中で CSA の 28 週間 + 4 週間の継続投与によって 3 血球系のいずれか 1 系統以上に major response または minor response が得られた群 (有効群) は 8 例、無効群は 5 例であった。

骨髄細胞密度を 5 段階評価したところ、治療前過形成 (細胞密度 4 または 5) であった 8 症例中有効群は 3 例、無効群 5 例で、細胞密度 5 であった 4 例はいずれも治療無効であった。一方細胞密度 3 以下であった 5 例は全例治療有効であった。

免疫組織化学染色については現在検討中で

ある。骨髄単位面積あたりの CD3 陽性細胞数は CSA 治療によって減少した症例が多いが、治療効果との関連は不明瞭であった。CD34 陽性細胞数や L26 陽性細胞 (B リンパ球) 数との関連その他について現在解析をおこなっている。

#### D. 考察

低リスク MDS に対する免疫抑制療法においては既にいくつかの治療効果予測因子が提示されているが、本検討では骨髄病理学的観点から、とくに免疫組織化学染色所見から治療効果予測因子の抽出を試みた。

少数例の検討であるが、過形成骨髄の症例では治療効果が期待できないと考えられた。骨髄クロット標本の免疫組織化学染色については現在解析中である。このように骨髄クロット標本の検索は抗原の保存性や技術上の問題など種々の制約を受けるが、標本の確保さえできれば遺伝子研究も含めて後日詳細な解析が可能であり、重要な情報が得られる可能性もある。

#### E. 結論

低リスク MDS の CSA 治療前後における骨髄病理学的所見の変化を免疫組織化学染色にて検討し、現在治療反応性との関連を解析中である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 通山 薫、石川隆之：第 46 回日本臨床血液学会総会シンポジウム 1. 特発性造血障害-最近の進歩「不応性貧血の免疫抑制療法-本邦におけるシクロスポリン療法について」臨床血液 46: 324-329, 2005

##### 2. 学会発表

1. 通山 薫：教育講演 3 & 1 5 「MDS-この難解な疾患へのアプローチ」第 6 7 回日本血液学会総会・第 4 7 回日本臨床血液学会総会・合同総会. 2005. 9. 17&18, 横浜市 (Education Program Book, The Joint Meeting of the 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Hematology and the 47<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Clinical Hematology: 21-27, 2005)

## PNH および骨髄不全症候群におけるストレス誘導型膜蛋白(ULBP, MICA)の発現と臨床的意義

研究協力者 中熊秀喜 (和歌山県立医大 血液内科 教授)

川口辰哉、\*花岡伸佳、\*堀川健太郎 (熊本大医学部 感染免疫診療部、\*血液内科)

長倉祥一 (国立病院機構熊本医療センター 血液内科)

### 研究要旨

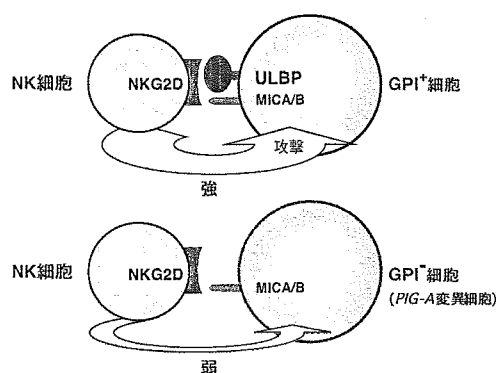
骨髄不全症候群における造血障害にストレス誘導型膜蛋白 (ULBP, MICA) 発現が関与するか検討した。約6割のPNH患者でストレス蛋白発現血球が検出され自己リンパ球による傷害を受けた。このような血球は再生不良性貧血(60%)やMDS(36%)の患者でも認められたが、健常人や他の貧血患者では認められなかった。骨髄不全症候群患者の少なくとも一部ではストレス蛋白介在性の造血細胞傷害が起こり、ストレス蛋白発現は造血障害の臨床的指標となる可能性がある。

### A.研究目的

ストレス誘導型膜蛋白(以下ストレス蛋白) ULBP1-3, MICA/B は、NKG2D 受容体を介してNKやCTLを活性化する。このストレス蛋白を膜発現するK562細胞はNK細胞障害を強く受けるが、*PIG-A* 変異を獲得するとGPI蛋白であるULBPのみ発現できずNK感受性が低下し、その攻撃をエスケープすることを我々は見出した(図1, Hanaoka N, et al. *Blood* 2006)。PNH患者血球でも同様の現象が想定されることからPNHや関連造血不全疾患におけるストレス蛋白発現の臨床的意義を検索した。

### B.研究方法

PNH 17名、再生不良性貧血(AA) 50名、不応性貧血(MDS) 22名の骨髄不全症候群患者および健常人17名、鉄欠乏性貧血など他



(図1) ULBP欠損に起因するPIG-A変異細胞のNK感受性低下

の貧血患者8名を解析した。まず顆粒球およびCD34陽性骨髄細胞(一部患者)におけるULBP1-3およびMICAの血球膜発現をフローサイトメトリーで解析した。次にストレス蛋白膜発現血球が、NKG2D陽性自己リンパ球により細胞傷害を受けるか<sup>51</sup>Cr遊離法で測定した。

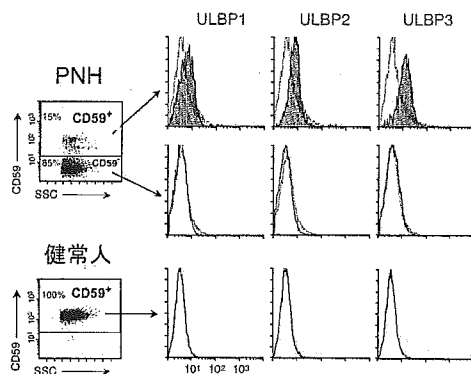
### C. 研究結果

#### 1) ストレス蛋白膜発現解析

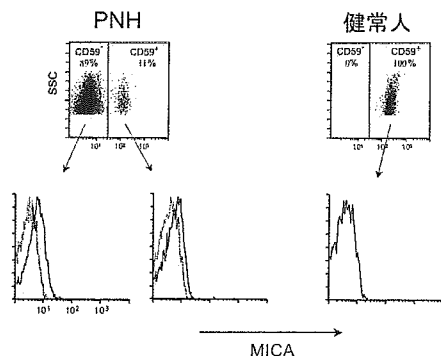
典型患者例では、ULBP1-3 は CD59<sup>+</sup>顆粒球のみに発現し (図2)、非 GPI 蛋白である MICA は CD59<sup>-</sup>顆粒球にも発現していた (図3)。結局、いずれかのストレス蛋白発現が認められた患者は PNH59%、AA60%、MDS36%であったが、健常人や他の貧血患者には全く認められなかった。

#### 2) 細胞傷害試験

ストレス蛋白陽性顆粒球は NKG2D 陽性の自己リンパ球により細胞傷害を受けたが、陰性顆粒球は受けなかった。



(図2) 顆粒球における ULBP 膜発現



(図3) 顆粒球における MICA 膜発現

### D. 考察

骨髄不全症候群の少なくとも一部の患者では、ULBP, MICA 発現を誘導する何らかのストレスの存在が示唆される。しかも、これら蛋白を発現した血球は自己リンパ球により攻撃を受けることから、ストレス蛋白発現が免疫機序による造血障害を誘導する可能性が示された。

### E. 結論

ULBP, MICA は病態を反映した自己免疫性造血障害の優れた臨床的指標となりうる。

### F. 研究発表

#### 8. 論文発表

1. Hanaoka N, et al: Immunoselection by natural killer cells of *PIG-A* mutant cells missing stress-inducible ULBP. *Blood* 107: 1184-1191, 2006

#### 2. 学会発表

1. Hanaoka N, et al.: Appearance of stress-inducible protein ULBP on blood cells of patients with PNH, aplastic anemia and MDS: implications of ULBP in immune-mediated marrow injury. The 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, 12.10-13, 2005. Atlanta, USA.

2. 堀川健太郎, 他. 骨髄不全症候群における自己免疫の新しい指標: 細胞傷害性リンパ球活性化ストレス蛋白 ULBPs, MICA/B の出現. 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会, 2005年. 横浜

## 骨髓異形成症候群における間葉系幹細胞の性質の解析

研究協力者 新津洋司郎 (札幌医科大学内科学第4講座教授)

松永卓也、佐藤 勉 (札幌医科大学内科学第4講座)

### 研究要旨

MDSのMSCでは高い頻度で染色体異常が観察される事を根拠に、MDSの一因としてMSCの機能不全が推測されている (Leuk Res 29: 215-224, 2005)。我々は19症例の造血器疾患患者における血球およびMSCの染色体異常の有無を検討した。その結果、10症例の血球に染色体異常を認めたが、MSCに染色体異常を認める症例は存在しなかった。今後、MDSの症例数を増やして検討することが必須であるが、現時点ではMDS患者のMSCにおける染色体異常の頻度はそれ程高くないことが予想される。

### A.研究目的

これまで我々は、骨髓異形成症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS) の骨髓ストローマ細胞を検討し、これらの細胞における granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-8, stem cell factor の発現に明らかな低下を認めなかった事から、MDSの病因がストローマ細胞の機能不全に帰結されない可能性を報告した (Br J Haematol 85: 676-683, 1993)。一方で我々は、ストローマ細胞などへの多彩な分化能を維持しながら分裂・増殖する間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) も、造血幹細胞の分化・増殖において重要な役割を果たす事を明らかにした (Exp Hematol 31, 715-722, 2003)。しかしながら、MDSのMSCでは高い頻度で染色体異常が観察される事を根拠に、MDSの一因としてMSCの機能不全が推測されている (Leuk Res 29: 215-224, 2005)。そこで今回

我々は、MDS症例のMSCにおいて、染色体異常の有無、細胞増殖率を検討したので報告する。

### B.研究方法

MDS 6例 (RA 4例, RAEB-2 2例), AML 6例, CML 2例, Non-Hodgkin's lymphoma 2例, ALL 1例, PV 1例, Aplastic anemia 1例, ITP 1例, Multiple myeloma 1例の合計19症例の造血器疾患患者の腸骨から骨髓穿刺で骨髓液を吸引し、Ficoll-Paqueによる比重遠心分離法を用いて単核球分離を行った。得られた単核球を10%FCS添加DMEMで一晩培養し、翌日には浮遊細胞を吸引破棄した。フラスコ底面に接着する細胞のみを同一の培地で培養し、浮遊する細胞は繰り返し吸引破棄した。約30日間の培養によって得られた接着細胞をMSCの染色体分析はG-band法で解析した。細胞増殖の検討では、 $1 \times 10^6$ のMSCを培養し、14日間後の細胞数を血球計算版でカウントし

て増殖率を計算した。

(倫理面への配慮)

患者には書面を用いて研究の目的を十分説明し、インフォームドコンセントを得た。氏名のプライバシーは一切公表しない。今後、採取した骨髓液および末梢血液は原則として使い切る。万が一研究終了後に残存したものは、内科学第4講座が5年間厳重に保管した後に破棄し、他の目的には転用しない。

#### C.研究結果

19 症例の造血器疾患患者の内、10 症例の血球に染色体異常を認めたが、MSC に染色体異常を認める症例は存在しなかった。MSC の細胞増殖率は現在検討中である。

#### E 考察

今後、細胞増幅率およびサイトカイン産生能を解析するとともに、MDS の症例数を増やして検討することが必須であるが、現時点では MDS 患者の MSC における染色体異常の頻度はそれ程高くないことが予想される。

#### F 結論

今後、MDS の症例数を増やして検討することが必要である。

#### G 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし



# 造血障害の成因における骨髓微小環境の役割に関する研究

研究協力者 堀田知光 (東海大学医学部・教授)

## 研究要旨

本年度は骨髓内移植法を利用してマウス内でヒト造血微小環境を再構築するアッセイを開発した。本アッセイ系を用いて再生不良性貧血、骨髓異形成症候群などの造血障害の成因における骨髓微小環境の役割を明らかにすることが期待される。

### A. 研究目的

われわれは NOD/SCID マウスへの骨髓内 (iBM) 移植法を利用して、ヒト臍帯血 CD34 細胞の生着効率の改善 (Blood, 101, 2905-2913, 2003)、マウス間葉系幹細胞の生着 (Blood 104, 3581-3587, 2004) を報告してきた。間葉系幹細胞は非造血系の骨髓幹細胞であり、骨髓内微小環境を提供していることが推測されているが、直接の証明はなされていない。今回われわれはヒト間葉系幹細胞を NOD/SCID マウスへ骨髓内移植し、その分化と造血維持機を検討した。

### B. 研究方法

ヒト間葉系幹細胞(MSC)および臍帯血 CD34 細胞をそれぞれレンチウイルスを用いて GFP および YFP で標識した。

### C. 研究結果と考察

10<sup>6</sup>個の GFP<sup>+</sup> MSC を iv および iBM にて投与した。4 週後に骨髓内 GFP<sup>+</sup> 細胞を測定した。iv 法ではほとんど細胞が検出されなかったが iBM 法では GFP<sup>+</sup> 細胞を認めたので、以後の実験は iBM 法を用いた。10 週後に生着している GFP<sup>+</sup> 細胞を同定した。細胞の 70% は endosteal 領域に認められた。60% の細胞が α-SM アクチン陽性であり、これらの中で血管内皮の外側に存在するものは pericyte、それ以外の細胞は myofibroblast と同定された。ALP 陽性の細胞は reticular cell と同定された。更に osteocalcin 陽性の osteocytes, N-cadherin 陽性の osteoblast

が同定された。これらの細胞はヒト造血細胞と接して存在している像が多数認められた。これらヒト MSC 由来骨髓微小環境の機能を調べるためにマウス右脛骨に MSC を移植した後

臍帯血 CD34 細胞を iv 移植し、生着を左右で比較した。右脛骨への生着率が有意に高く、含まれる CD34 細胞、コロニー形成細胞、SRC 数もいずれも右脛骨に多かった。更にヒト CD34, CD15, Gly-A 細胞で比較すると GFP<sup>+</sup> 細胞と接している細胞は CD34 細胞に多く、CD34 細胞と接している GFP<sup>+</sup> 細胞は endosteal 領域に多く認められた。以上の結果からヒト MSC 由来細胞はヒト造血幹細胞に対するニッチを提供することが明らかとなり、このアッセイを hematopoietic microenvironment repopulating cells (HMRC) アッセイと命名した。

### E. 結論

ヒト間葉系幹細胞は骨髓内で造血微小環境を再構築する。

### F. 健康危害情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Blood DOI 10.1182/blood-2005-06-2211 2005
- 2) Blood DOI 10.1182/blood-2005-08-3108

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究協力者 松田 晃（埼玉医科大学血液内科 助教授）  
別所正美、陣内逸郎、矢ヶ崎史治、荒関かやの（埼玉医科大学血液内科）  
朝長万左男、岩永正子、波多智子、對馬秀樹、境 麻里（長崎大学原研内科）

## 研究要旨

われわれは、日本とドイツのFAB分類のrefractory anemia (FAB-RA) 症例の臨床像の違いを報告した。この違いがアジア例に共通する可能性を考え、日本・中国MDS共同研究を開始した。その結果、日本/中国のFAB-RA症例はドイツ例と比較し、発病年齢が低い、染色体異常のある症例の頻度が低い、2年生存率が高いなどの特徴が認められた。日本のFAB-RA症例の臨床的特徴は中国と共通することが推測された。

### A.研究目的

骨髄異形成症候群（MDS）症例の本邦例と欧米例の臨床像の違いが報告されている。われわれは、日本とドイツのFAB分類のrefractory anemia (FAB-RA) を対象とし、その臨床像の違いを報告した<sup>1)</sup>。この検討では、日本のFAB-RA症例はドイツ例と比較し、有意に診断時年齢が若く、好中球数・Hb濃度・血小板数が低値で、2系統以上の血球減少を認める症例の頻度が高かった。日本例は染色体異常のない症例の頻度が高く、5q- syndromeの症例の頻度が低かった。IPSSでは、日本例ではINT-1に分類される症例の頻度が高く、ドイツ例ではLowとINT-1に分類される症例がほぼ同頻度であった。日本例のcumulative risk of acute leukemia evolutionはドイツ例と比較し有意に低かった。予後を、Overall survival (OS)と、死因がMDSに関連しない例/死因不明例を死亡時点でセンサーしたModified survivalを用い

て検討したところ、OSでは全年齢、若年群(≤60歳)、高齢群(>60歳)でドイツ例と比較し日本例の予後が有意に良好であった。Modified survivalでは若年群(≤60歳)では日本例の予後が有意に良好であったが、高齢群(>60歳)ではドイツ例と日本例に差は認められなかった。OSでは日本例では年齢(>60歳)は有意な予後不良因子であったが、性、Hb濃度(<10g/dL)、血小板数(<100 x10<sup>9</sup>/L)、好中球数(<1.5 x10<sup>9</sup>/L)、血球減少(2 or 3 lineages)はOSに関連しなかった。ドイツ例では年齢、Hb濃度、血小板数、血球減少、IPSS cytogenetic subgroupsは有意な予後不良因子であったが、性、好中球数はOSに関連しなかった。Cumulative risk of acute leukemia evolutionでは、日本例ではIPSS cytogenetic subgroupsとIPSS subgroupsが、ドイツ例では好中球数、血小板数、血球減少、IPSS cytogenetic subgroups、IPSS subgroupsが有意に関連した。

われわれの報告と同様に、アジア諸国より欧米の報告と MDS の臨床像が異なること、診断時年齢は欧米例より若く、血球減少が MDS の予後不良因子にならないことが報告されている。よって、われわれはドイツ例とは異なる日本の FAB-RA 例の特徴が、他のアジア諸国に共通する特徴である可能性を考え、これをあきらかにするために、蘇州医大を中心とした中国グループとの日本・中国 MDS 共同研究を開始した。

## B. 研究方法

60 例 (FAB-RA : 50 例, 再生不良性貧血 : 10 例) について、日本と中国の検鏡者による日中の形態学的診断が一致するか否かについて検討したのち、日中独の FAB-RA 症例 844 例 (日本:131 例, 中国:116 例, ドイツ:597 例) の臨床像の比較検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

個人の特定期間可能な情報は用いない。

## C. 研究結果

日中検鏡者の診断一致率は 98.3% ( $\kappa$ , 0.94,  $P < .001$ ) であった。この結果より、日本と中国の検鏡者の形態学的診断は一致すると判定された。日中独症例の臨床像の比較ではつぎの結果を得た。(a) 診断時年齢が日本例 (57 歳) / 中国例 (53 歳) はドイツ例 (71 歳) と比較し低かった。(b) 染色体異常のある症例の頻度が日本例 (29%) / 中国例 (28%) はドイツ例 (51%) と比較し低かった。(c) 5q-synd の頻度が日本例 (2.9%) / 中国例 (0.6%)

はドイツ例 (19.7%) と比較し低かった。(d) IPSS risk subgroups の INT-1 の頻度が日本例 (71.6%) / 中国例 (69.5%) はドイツ例 (45.3%) と比較し高かった。(e) 日本例 / 中国例では血球減少が予後不良因子にならなかった。(f) 2 年生存率が日本例 (80%) / 中国例 (80%) はドイツ例 (60%) と比較し高かった。

## D. 考察

ドイツ例と異なる日本の FAB-RA 症例の臨床的特徴が、中国の FAB-RA 症例に共通する特徴である可能性が推測された。今後さらに詳細に検討を続けていく予定である。

## E. 結論

日本の FAB-RA 症例の臨床的特徴と中国の FAB-RA 症例に共通する点が多かった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし。

### 2. 学会発表

該当なし。

## G. 参考文献

1. Matsuda A et al: Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. *Blood* 106:2633-2640, 2005

## ファンconi貧血(FA)における分子病態の研究

研究協力者 山下 孝之 (群馬大学・教授)

### 研究要旨

FAは進行性の血球減少を特徴とする先天性骨髄不全であるが、実際には様々な臨床経過を示す。すなわち、軽度の血球減少を長期間示す症例もあれば、骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病への進行もしばしば見られる。最近、復帰変異を持つ抹消血リンパ球(PBL)が増殖する体細胞モザイクと骨髄不全の軽症化の関連性が注目されている。我々は、長期間にわたり造血が維持されたFA症例で、復帰変異を持つ細胞の増殖が骨髄系細胞に選択的に見られる症例を見出し、FAにおける体細胞モザイクがPBLの解析のみでは見逃される可能性を示した。また、FA症例において高率にがん抑制遺伝子のメチル化異常が見られ、これが悪性化に関与する可能性を見出した。これら分子病態の解析はFAの予後や治療指針に重要な指標を与える可能性があり、さらなる研究が必要と考えらる。

### A.研究目的

1. FAは、通常は進行性の血球減少を示す先天性骨髄不全症候群である。最近、FA遺伝子の復帰変異を持つ末梢血リンパ球(PBL)が増殖する体細胞モザイクと骨髄不全の軽症化との関連性が注目されている。今回、我々はPBLに体細胞モザイクが見られないのに長期間にわたり血球減少が見られなかった症例の分子病態を解析した。
2. FAが高率に骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病への進行を示す理由として、DNA修復能の障害により、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が起こりやすくなる可能性が考えられているが証拠は示されていない。今回、我々はがん抑制遺伝子のメチル化異常が関与する可能性を検討した。

### B.研究方法

患者細胞から調製したDNAおよびRNAから、PCRあるいはRT-PCRで目的の遺伝子ある

いはcDNAを増幅し塩基配列を決定した。プロモーター領域のメチル化はメチル化特異的PCRで解析した。蛋白の発現はWestern blot法で解析した。

### C.研究結果

1. FANCA遺伝子変異を持つ患者において、18年以上にわたり血球減少が進行しない非典型的な経過が見られたため、復帰変異による体細胞モザイクを疑ったが、PBLでは検出できなかった。しかし、B細胞由来リンパ芽球でFANCAの機能的発現の回復と復帰変異が見られた。さらに解析を行ったところ、同様の復帰変異を持つ細胞が末梢血顆粒球と単核貪食細胞で優位であることが判明した。したがって、復帰変異を持つ骨髄系細胞の増殖による細胞系列選択的な体細胞モザイクにより骨髄不全が緩和されたと考えられる。
2. 11名のFA患者(MDS群-RA 2名、RAEB 2名；非MDS群-7名)の骨髄単核球において、5つの